

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Terapia celular CAR –T

Bernardo do Canto Lucas Antunes Marinheiro

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2019

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Terapia celular CAR -T

Bernardo do Canto Lucas Antunes Marinheiro

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

**Orientadora: Doutora Maria Henriques Lourenço Ribeiro, Professora
Associada**

2019

Resumo

Os CAR-T têm sido alvo de muita atenção por serem uma terapêutica inovadora, com excelentes resultados em casos em que mais nenhuma terapêutica os teve e por se tratar de uma imunoterapia com base no sistema imunitário do próprio doente. Inúmeros estudos estão a decorrer atualmente para desenvolver mais terapêuticas CAR-T, melhores e com menos efeitos adversos.

Esta monografia foca-se em entender a ciência por detrás desta revolucionária terapêutica, a fim de que, após a leitura desta tese de mestrado, sejam claros os conceitos básicos por detrás desta terapêutica CAR-T, os obstáculos que enfrenta de momento e possíveis soluções futuras para tornar esta terapêutica mais viável e mais acessível como tratamento de primeira ou de segunda linha.

Numa primeira parte da monografia, são abordados conceitos considerados base para o bom entendimento desta terapêutica como o sistema imunitário, desenvolvimento do cancro e a definição de CAR-T, assim como a estrutura destas células e a história do desenvolvimento desta terapêutica.

Posteriormente, o foco centra-se nos tratamentos já em curso com a tecnologia CAR-T assim como fármacos já aprovados no mercado como o YESCARTA e o KYMRIA. São abordados os protocolos destas terapêuticas, assim como os seus efeitos indesejados, avaliação e seleção dos doentes, consentimentos informados, preparação para o tratamento, gestão e monitorização dos doentes após o tratamento, relacionados com casos de cancro pediátrico.

Por fim, apresenta-se o primeiro caso clínico de sucesso da utilização da terapêutica CAR-T com a Emily Whitehead, uma criança que tinha seis anos a quando do tratamento e que sofria de Leucemia Linfocítica Aguda. Acrescentam-se também algumas conclusões e perspetivas futuras, como possíveis técnicas de alteração de células T a fim de melhorar o seu meio de ação e afinidade às células tumorais, obter menores efeitos adversos, maior especificidade e desenvolver métodos menos invasivos.

Palavras chave: Cancro, CAR-T, Imunoterapia, recetores celulares, citocinas

Abstract

The CAR-T has been latest attention focus for being an innovative therapy with excellent results at times no other treatment had and for being an immunotherapy based on the patient's own immunologic system. Countless studies are happening at the moment to develop more and new CAR-Ts with better results and less adverse effects.

This master thesis focuses on understanding the science behind this revolutionary immunotherapy. The basic concepts about CAR-T, the obstacles ahead and possible future improvements to the therapy will be a main focus in an attempt to reach better CAR-T treatments who might become second or even first line options for cancer patients.

Firstly, in order to understand the therapy, it is necessary to set the ground by defining concepts such as immunotherapy cancer and how it appears and develops and the very one definition of CAR-T and their structure as well as the history behind their scientific growth.

Secondly, the focus turns to treatments already accepted by the regulatory entities such as YESCARTA and MARIAH. The treatment protocols, adverse effects, evaluation and patient selection, informed consents, treatment preparation, management and monitorization of patients will be addressed.

Thirdly, the first ever paediatric clinical case of success with CAR-T therapy is discussed as we dive in the case of Emily Whitehead, a girl that fought Acute Lymphoblastic Leukaemia at 6 years of age. A few final conclusions and future perspectives are shared, like possible new techniques to alter the T cells to better their action mechanism, their affinity to tumour cells and to reduce adverse effects.

Key words: Cancer, CAR-T, Immunotherapy, Cellular receptors, Cytokines

Agradecimentos

Família – por ser o meu ponto de partida, por me ajudarem a arrancar em força para qualquer desafio e me apoiarem sempre e incondicionalmente até ao fim.

Irmandade – pelos cinco anos de faculdade incríveis que com vocês valeram por mais.

Amigos – por partilharem o meu percurso independentemente da fase em que participaram, cada passo foi importante e, felizmente, nunca foi dado sozinho.

EPSA – pelas experiências e pelo quanto me puxou para trabalhar mais e melhor.

Professores e locais de ensino – o que me ensinaram não resultou só nesta tese, mas, por agora, é aqui que vos agradeço e vos espero ensinar alguma coisa de volta.

Todos os outros – Se não estás em nenhuma das secções em cima, ainda vais a tempo, isto não acaba com esta tese!

Bernardo Marinheiro – Obrigado e continua!

Lista de abreviaturas

AAPC - Células apresentadoras de antígeno artificiais
ACT - Transferência adotiva de células
AICD - Apoptose e morte celular induzida por ativação
AIM - Autorização de Introdução no Mercado
AIM - Autorização de Introdução no Mercado
APC - Célula apresentadora de antígeno
AST - Aspartato aminotransferase
BCMA - Antígeno de maturação de células B
CAR - Recetor de Antígeno Quimérico
CAR - Recetor de Antígeno Quimérico
CARTOX - “CAR-T cell therapy- Associated toxicity”
CCR - “Centre for Cancer Research”
cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar
cGMP - corrente procedimento de boas práticas de produção
CID - Coagulação Intravascular Disseminada
CTL019 - Células T CD19
DCs - Células dendríticas
DEVH -Doença do enxerto vs hospedeiro ativa
DLBCL - Linfoma difuso de células B grandes
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EMA - European Medicine Agency
EUA- Estados Unidos da América
FDA - Food and Drug Administration
FG CAR - CAR de primeira geração
HBv - vírus da Hepatite B
HCv - vírus da Hepatite C
HSCT - “Hematopoietic stem cell transplantation”
IL - Interleucina
IL-2 - Interleucina-2
IL-6 - Interleucina-6
IS - Sinapse imunológica

ITAMS - “immune-receptor tyrosine activation motifs”
LDGCB - Linfoma difuso das grandes células B
LLA - Leucemia Linfoblástica Aguda
LNH - Linfoma não-Hodgkin
LPGCBM - Linfoma primário das grandes células B mediastinais
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA - Ácido Ribonucleico mensageiro
PALISI - “Paediatric acute injury and sepsis investigators”
PRIME – “Priority medicines”
RNA - Ácido Ribonucleico
SAM/HLH -Síndrome de ativação macrofágica/Hemofagocítica linfo-histocitose
SERC - Síndrome de encefalopatia relacionada com células CAR-T
SG CAR - CAR de segunda geração
SLC - Síndrome de libertação de citocinas
scFv – single-chain variable Fragment
SNC - Sistema nervoso central
SVC - Síndrome de vazamento capilar
TAA - Antígenos específicos do Tumor
TCR - Recetor da célula T
TG CAR - CAR de terceira geração

Índice

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introdução | 12 |
| 1.1 | Sistema imunitário | 13 |
| 1.2 | Células T | 13 |
| 1.3 | Definição | 15 |
| 1.4 | História das CAR-T | 15 |
| 1.5 | Doenças tratadas com esta nova terapia | 16 |
| 2 | Materiais e métodos | 18 |
| 3 | Tecnologia | 18 |
| 3.1 | Estrutura CAR | 18 |
| 3.1.1 | Extracelular(16) | 18 |
| 3.1.2 | Espaçador e domínio transmembranar(16) | 19 |
| 3.1.3 | Intracelular(16) | 20 |
| 3.2 | Processo | 22 |
| 3.2.1 | Obtenção das células T | 23 |
| 3.2.2 | Ativação das células T | 24 |
| 3.2.3 | Modificar células T geneticamente | 24 |
| 3.2.4 | Expansão de células CAR-T | 25 |
| 4 | Tratamentos | 27 |
| 4.1 | Fármacos Aprovados | 27 |
| 4.2 | Caraterísticas do Tisagenlecleucel e do Axicabtagene ciloleucel | 29 |
| 4.2.1 | Procedimentos para administração de YESCARTA e Posologia(23) | 29 |
| 4.2.2 | Efeitos Indesejáveis(23) | 30 |
| 4.2.3 | Procedimentos para administração de KYMRIA e Posologia(24) | 32 |
| 4.2.4 | Efeitos Indesejáveis(24) | 33 |
| 4.3 | Tocilizumab (RoActemra)(25) | 34 |
| 4.4 | Diretrizes de gestão de doentes pediátricos que receberam terapia CAR-T(26) | 35 |
| 4.4.1 | Avaliação e Seleção do Doente(26) | 37 |
| 4.4.2 | Consentimento informado(26) | 37 |
| 4.4.3 | Preparação para o tratamento de depleção linfocítica(26) | 38 |
| 4.4.4 | Administração das células(26) | 40 |
| 4.4.5 | Gestão, Classificação e Monitorização do SLC(26) | 40 |
| 4.4.6 | SERC(26) | 41 |
| 4.5 | Considerações Éticas(26) | 42 |

| | | |
|------------|-------------------------------------|-----------|
| 4.6 | Resistências | 42 |
| 5 | Caso Clínico | 43 |
| 6 | Prospeções Futura/Limitações | 44 |
| 7 | Referências Bibliográficas | 46 |

Índice de figuras

Figura 1 - Design de Células CAR-T FG, SG, TG.

Figura 2 - Imagem esquemática de uma terapia com recetores quiméricos de antigénio.

Figura 3 - Principais passos na produção de CAR-T.

Figura 4 – Emily Whitehead celebra 7 anos livre de cancro.

Figura 5 - Abordagens para melhorar a terapia CAR-T.

Índice de tabelas

Tabela 1 - Diretrizes para a gestão e grau de SCL.

Tabela 2 - Diretrizes da avaliação e das reações adversas neurológicas.

Tabela 3 - Algoritmo para a gestão de SLC.

Tabela 4 - Resumo das principais recomendações para o uso da terapia celular CAR-T.

Tabela 5 - Regimes de depleção linfocítica em doentes pediátricos.

Tabela 6 - Classificação e Gestão do SLC.

1 Introdução

A maioria das células do corpo humano são diferenciadas e têm um determinado tempo de vida. Elas formam-se e eventualmente morrem num processo conhecido como apoptose, quando estão velhas e/ou danificadas, sendo substituídas por novas células.

Carcinogénese é o processo através do qual as células cancerígenas se desenvolvem. É um processo que, de acordo com a Teoria da Mutação Somática, envolve alterações e dano no material genético e nas vias celulares, levando a uma divisão descontrolada das células, tornando algumas delas imortais. Este processo pode começar em quase qualquer local do corpo (1) e pode ser dividido em quatro fases: Iniciação, promoção, conversão maligna e progressão.(2)

Iniciação é a fase que implica dano e mutações genéticas que acontecem devido a fatores genéticos que podem ser hereditários ou são o resultado de exposição a fatores ambientais(3) que levam a alterações nos genes de síntese e reparação no ácido desoxirribonucleico (DNA). As consequências são a inativação de genes supressores de tumores e a ativação de oncogenes.(4,5) A fase de promoção consiste na ativação metabólica através de oncopromotores que leva à expansão das células mutadas. A fase de conversão maligna consiste na conversão da célula pré-neoplásica numa nova que expressa o fenótipo do tumor. O grau de conversão está diretamente relacionado com a velocidade de divisão celular. O gene p53 é o alvo mais comum para as alterações genéticas em tumores humanos. Sofre alterações em mais de 50% dos casos. Esta alteração pode ocorrer em todos os tipos de cancro.(5–7) Por fim, na fase da progressão tumoral, o cancro já está formado. É a fase caracterizada pela expressão total do fenótipo maligno com a possibilidade de adquirir características mais agressivas para o organismo.(8,9)

O crescimento e proliferação descontrolados das células cancerígenas pode levar à angiogénese, a formação de novos vasos sanguíneos que vão servir de suporte ao crescimento do tumor ao fornecer oxigénio e nutrientes. Algumas das células do tumor podem invadir tecidos adjacentes e propagar o tumor através dos vasos sanguíneos e do sistema linfático, processo chamado de metastização que só acontece em tumores malignos.(10)

A fim de determinar o nível de proliferação celular e obter informação importante em relação às alterações no ciclo celular, analisa-se um histograma do DNA através de uma citometria de corrente.

1.1 Sistema imunitário

O sistema imunitário é composto pelo sistema inato e o sistema adaptativo. O sistema inato é a primeira linha de defesa e atua com rapidez enquanto que o sistema adaptativo apresenta memória imunológica e é composto por células como T e B que são altamente específicas para qualquer ameaça patogénica.(11) Para além da função de combater com patógenos externos, o sistema imunitário tem funções na manutenção da homeostasia dos tecidos e da integridade do sistema. É uma parte fundamental em processos fisiológicos como o desenvolvimento, reprodução e curar de feridas, e encontra-se ligado aos diversos sistemas do organismo como o metabolismo, sistema nervoso central e sistema cardiovascular.(12)

1.2 Células T

Os linfócitos T desempenham um papel importante no sistema imunológico, orquestrando interações complexas entre as células imunes inatas e adaptativas. A proteção contra várias infeções, assim como contra o cancro, é fornecida de maneira específica para o antígeno, com memória imunológica, como resultado das funções dos linfócitos T saudáveis.

A capacidade especial das células T de reconhecer antígenos de vários agentes patogénicos ou mutações endógenas de uma maneira muito específica, sensível e seletiva é conferida por uma molécula recetora restrita a clones, o recetor da célula T (TCR). Este recetor interage com o “Major Histocompatibility Complex” (MHC), encontrado à superfície das células apresentadoras de antígenos (APC) como as células dendríticas (DC). Esta interação é necessária para o reconhecimento da ameaça patogénica pelas células T e para a sua ativação.

Assim, a interface celular entre a célula T e a célula de contraparte é muito importante para determinar as funções das células T e foi descrito como a sinapse imunológica (IS).

O TCR é um heterodímero de cadeias alfa e beta ou cadeias gama e delta, e a célula T que expressa os pares correspondentes é denominada célula T $\alpha\beta$ ou célula T $\gamma\delta$, respetivamente. (O TCR $\alpha\beta$ demonstra um alto grau de especificidade antigénica e, portanto, torna-se uma molécula marcante do sistema imunológico adaptativo, juntamente com o anticorpo da célula B. Em contraste, as células T $\gamma\delta$ reconhecem classes de antígeno presentes nas faixas de patógenos, cujas funções maioritariamente pertencem à imunidade inata.

Devido ao papel único das células T que respondem aos patógenos de uma forma específica para o antígeno, a interação entre o TCR e o MHC determina o seu destino e

função em quase todos os estágios da vida de uma célula T desde o seu desenvolvimento inicial no timo até ao estágio efetivo, totalmente ativado e terminalmente diferenciada na periferia.

Além do TCR, há dois tipos de coreceptores designados como CD4 e CD8 na membrana da célula T, e uma célula T individual está comprometida em expressar apenas um tipo de coreceptor antes de estar completamente desenvolvida e sair do timo. Refletindo as suas respectivas funções efectoras, as células T CD4 + e T CD8 + são chamadas de células T “auxiliares” e células T “citotóxicas”, respetivamente. TCRs em células T CD4 + interagem apenas com peptídeos exógenos apresentados por moléculas do MHC de classe II que são expressas apenas por APCs fagocitários específicos, tais como células dendríticas (DCs), macrófagos e células B. Enquanto isso, os TCRs em células T CD8 + interagem apenas com peptídeos de origem própria ou víricos, apresentados por moléculas de MHC de classe I que são expressas pela maioria das células, incluindo APCs específicos. Apesar dessa diferença crítica entre as células T CD4 + e CD8 +, a população de ambos os tipos necessita de ser ativada corretamente antes de poder funcionar como células efectoras.

Como descrito anteriormente, a interação entre o TCR e o peptídeo estranho apresentado por moléculas de MHC classe I ou classe II expressas na membrana plasmática de APCs específicas torna-se um sinal primário para a ativação de células T e determina a ativação inicial de células T “naïve”. No entanto, uma mera interação TCR-MHC não é suficiente para ativar completamente uma célula T “naïve”. O requisito adicional é chamado de co estimulação, e existem múltiplas interações moleculares entre uma célula T e uma APC que fornecem sinais co estimulatórios. O mais importante é o acoplamento do CD28 na célula T pelo CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2) na APC. É mostrado que o TCR envolvido pelo MHC sem sinais de co estimulação induz a célula T a um estado “anérgico”. Uma vez que a célula T se torna anérgica, ela mantém esse estado inativado mesmo quando a célula T é exposta à APC tanto com MHC antigénico como com moléculas co estimuladoras. O terceiro componente que completa a ativação da célula T são as várias citocinas. Algumas destas citocinas solúveis são secretadas pela própria célula T ou pela APC vizinha ou outras células reguladas por “loops de feedback”. As citocinas secretadas pela própria célula T podem funcionar como autócrinas e parácrinas. Como exemplo, a interleucina-2 (IL-2) secretada por células T é importante para a expansão clonal de populações de células T específicas para o antígeno e para a sua diferenciação em células efectoras.(13)

1.3 Definição

“A terapia CAR é ao mesmo tempo terapia celular, terapia genética e imunoterapia.”, disse Michel Sadelain, cofundador da Juno Therapeutics, ao The Scientist.

Imunoterapia do cancro é definido como a abordagem ao tratamento do cancro, gerando ou aumentando a resposta imunitária ao mesmo. Imunoterapia anti tumoral tem um vasto potencial e poderá ser utilizada para tratar diferentes e avançados tipos de tumor devido à resposta duradoura e robusta que provoca num diverso espectro de tumores.(14)

Uma terapia CAR-T consiste na infusão de células T alteradas em laboratório que expressam um Recetor de Antigénio Quimérico (CAR) na sua membrana celular. Este recetor conta com um domínio de ligação ao alvo externo projetado para reconhecer um antígeno tumoral específico e um domínio de ativação interna responsável por ativar a célula T quando a CAR-T se liga ao seu alvo. Os CAR-Ts de segunda e terceira geração possuem domínios adicionais que melhoram a resposta imunológica.

O procedimento mais comum em terapia com células CAR-T começa com a extração de células T do próprio doente, um processo chamado leucoferese. As células T são então geneticamente modificadas para expressar um CAR e expandidas in vitro. Finalmente, as células CAR-T são perfundidas no doente, prontas para combater o tumor.

Os ensaios clínicos da CAR-T mostraram grandes taxas de remissão, de até 94%, nos cancros mais graves. Este facto é particularmente impressionante, considerando que a maioria dos ensaios clínicos das CAR-T recrutam doentes com cancro que não responderam a muitos, senão a todos os outros tratamentos disponíveis.(14)

1.4 História das CAR-T

Durante anos, as bases de tratamento em oncologia foram cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Nas últimas duas décadas, terapias direcionadas como o imatinibe (Gleevec®) e o trastuzumabe (Herceptin®) - medicamentos que atacam as células cancerígenas ao se concentrarem em mudanças moleculares específicas vistas primariamente nessas células - também se consolidaram como tratamentos padrão para muitos tipos de tumores.

A capacidade de utilizar as nossas próprias células do sistema imunológico para combater o cancro certamente criou grandes expectativas para uma possível remissão de inúmeras doenças oncológicas. Após o sucesso dos primeiros inibidores de checkpoint no mercado, a atenção de inúmeros cientistas voltou-se para a terapia CAR-T, o seguinte grande tratamento contra o cancro a atingir o mercado.

Uma abordagem de imunoterapia em rápida emergência é chamada de transferência adotiva de células (ACT): consiste em coletar e usar células imunes dos pacientes para tratar o tumor. Existem vários tipos de ACT (ver “ACT: TILs, TCRs e CARs”), mas, até agora, aquele que avançou mais longe no desenvolvimento clínico é chamado de terapia de células CAR-T.

Até há pouco tempo atrás, o uso de terapia com células CAR-T foi restrito a pequenos estudos clínicos, principalmente em pacientes com cancro do sangue em estado avançado. Mas esses tratamentos, captaram a atenção de investigadores e do público por causa das respostas notáveis verificadas em alguns doentes - crianças e adultos - para os quais todos os outros tratamentos não tiveram o efeito desejado.

Em 2017, duas terapias de células CAR-T foram aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA), uma para o tratamento de crianças com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e outra para adultos com Linfomas avançados. Nessa altura, os investigadores alertaram que, em muitos aspetos, ainda era cedo para saber se as células CAR-T e outras formas de ACT, seriam eficazes contra tumores sólidos como cancro da mama e do cólon.

As diferentes formas de ACT "ainda estão a ser desenvolvidas", disse Steven Rosenberg, MD, Ph.D., chefe do Núcleo de Cirurgia do Centro de Pesquisa do Cancro do NCI (CCR), um pioneiro da imunoterapia cujo laboratório foi o primeiro a relatar o sucesso do tratamento do cancro com células CAR-T.

1.5 Doenças tratadas com esta nova terapia

Aqui estão 3 exemplos de tratamento utilizando a imunoterapia celular adotiva:

Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância (LLA) - Cerca de 3 em cada 4 crianças com leucemia são diagnosticadas com LLA. O tratamento para esta forma de leucemia melhorou muito ao longo dos anos, de forma que 90% das crianças ainda estão vivas 5 anos após o diagnóstico. Mas, anualmente, cerca de 600 crianças e jovens adultos que tiveram o tratamento padrão para a LLA vêm a doença a ressurgir, e, nesses casos, o tempo de sobrevivência é geralmente de algumas semanas ou meses.

Num ensaio clínico com crianças e adultos jovens com LLA que não tinham cessado o tratamento padrão, uma terapia de células CAR-T chamada tisagenlecleucel (Kymriah) levou à remissão da doença em 52 dos 63 pacientes. Após 6 meses verificou-se que em 3 em cada 4 doentes, a LLA não tinha ressurgido. Com base nos resultados deste estudo, em agosto de

2017, a Food and Drug Administration dos EUA (FDA) aprovou o tisagenlecleucel no tratamento de crianças e adultos jovens com LLA recorrente.

Linfoma não-Hodgkin (LNH) - O linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) é o subtipo mais comum de linfoma não-Hodgkin e é bastante agressivo. Muitas pessoas podem ser tratadas com sucesso com uma combinação de quimioterapia e rituximab (Rituxan), uma terapêutica direcionada. No entanto, esses tipos de linfomas podem por vezes piorar durante o tratamento, chamado de “linfoma refratário”, ou podem voltar após o tratamento, chamado de “linfoma recorrente”. Nestes casos, células CAR-T podem ser uma opção viável.

Num ensaio clínico foi utilizado o tisagenlecleucel para tratar pessoas com DLBCL que pioraram após pelo menos dois tratamentos anteriores. O linfoma entrou em remissão em 43% dos doentes em estudo. Após 6 meses da terapia de células CAR-T, o linfoma não tinha reaparecido em quase 80% dos doentes.

Outro estudo utilizou uma terapia de células CAR-T diferente, para tratar o linfoma refratário ou linfoma recorrente. Neste estudo, as pessoas tinham DLBCL, linfoma primário do mediastino grande de células B (uma forma agressiva de DLBCL que se forma no peito), ou linfoma folicular transformado (um subtipo de LNH de crescimento lento que se transformou em DLBCL), iniciaram a terapêutica com células CAR-T denominadas de axicabtagene ciloleucel (Yescarta). A imunoterapia diminuiu ou interrompeu o crescimento das células malignas em 82% dos pacientes, e o cancro desapareceu completamente em mais da metade (54%). Após quase 9 meses, cerca de 40% dos doentes ainda não apresentavam sinais de cancro. Em outubro de 2017, a FDA aprovou o axicabtagene ciloleucel para o tratamento de DLBCL que não foi interrompido por dois ou mais tratamentos anteriores.

Mieloma múltiplo - O mieloma múltiplo é um tipo de cancro de sangue que envolve as células plasmáticas da medula óssea. As células plasmáticas desempenham um papel importante no sistema imunológico do corpo. O mieloma múltiplo é uma doença incurável e apenas cerca de 50% das pessoas vive 5 anos após o diagnóstico.

Os resultados de um ensaio clínico inicial apresentado no Encontro Anual da ASCO de 2017 mostraram que um tipo de terapêutica com células CAR-T que utiliza um biomarcador conhecido como antigénio de maturação de células B (BCMA) pode impedir a progressão do mieloma múltiplo. Este estudo incluiu 35 pessoas com mieloma múltiplo nas quais a doença reapareceu após o tratamento, chamado de recorrente ou recorrente, ou foi resistente ao tratamento, chamado refratário. Desses 35, 33 doentes (94%) viram o mieloma entrar em remissão, 2 meses após o tratamento com células BCMA CAR-T.(15)

2 Materiais e métodos

A fim de obter o máximo de informação, numa fase inicial recolheram-se artigos através da internet em sites como o Pubmed, ScienceDirect databases e o Google Scholar e através de professores da Faculdade de Farmácia na Universidade.

Numa segunda fase, e após uma leitura rápida dos artigos, foram selecionados os artigos mais relevantes para o trabalho em questão. Esta seleção focou-se em artigos com casos/informação sobre CAR-T em pediatria, informação geral sobre a terapia e interesse nas conclusões e prospeções futuras.

3 Tecnologia

3.1 Estrutura CAR

CARs são moléculas de ácidos nucleicos sintetizadas compostas por três frações: extracelular; espaçador e transmembranar.(16)

3.1.1 Extracelular

Este domínio consiste em anticorpos de cadeia única que se ligam a antígenos específicos do tumor (TAA).

A segurança e efetividade da engenharia CAR vai depender muito da identificação e seleção de um antígeno alvo de superfície.

Normalmente, esta zona extracelular que se considera o domínio de reconhecimento de antígenos é um fragmento variável de cadeia única (scFv), proveniente das regiões pesadas e leves variáveis de um anticorpo monoclonal reativo ao tumor.

Esta parte da tecnologia CAR, leva as células T a penetrar mais facilmente e igualmente ao longo do tumor, dando início à sinalização das células T. Ao contrário dos ligandos de receptores de células T naïve, em que o respetivo antígeno associado ao tumor (TAA) é apresentado pelo complexo de histocompatibilidade major (MHC), os CAR conseguem reconhecer antígenos da superfície celular não processados e desencadear funções efetoras de uma maneira dependente do anticorpo, não dependente do MHC

Esta característica permite às células CAR-T a vantagem de terem efeito em tumores nos quais existe perda da variante MHC. Para além disto, os alvos do scFv podem ser proteínas, antígenos peptídicos, moléculas marcadoras de superfície, carboidratos,

glicolípidos e gangliosídeos ou qualquer outra estrutura para a qual um anticorpo esteja disponível.

Um CAR ideal devia não só ser expresso no tumor como devia ser essencial à sua sobrevivência. Não devendo esquecer que, a expressão da maioria dos antígenos não é limitada às células tumorais, fazendo com que a terapia CAR possa resultar em inúmeros efeitos adversos em tecido normal.

O scFv é um módulo sintético que consiste em cadeias variáveis, pesadas e leves, juntamente com um linker peptídico longo. Consequentemente, proteínas CAR construídas de uma forma específica conseguem reconhecer vários antígenos dos tumores ou apontar a um dos diferentes epítomos do mesmo alvo. Alguns dos seus elementos variáveis que podem alterar a resposta das células T alteradas são a afinidade dos scFv, a estrutura dos epítomos e a quantidade de antígeno expresso nas células tumorais.

Está comprovado que o scFv pode influenciar o nível de duração da expressão e efetividade das células CAR-T. (16)

3.1.2 Espaçador e domínio transmembranar

Estes têm a função de ancorar a molécula na membrana da célula e tomam um papel importante na expressão estável dos CAR na superfície das células T.

O espaçador normalmente consiste numa dobradiça ligada ao domínio da imunoglobulina na região Fc das IgG1 ou a domínios espaçadores das regiões extracelulares semelhantes à imunoglobulina de CD4 ou CD8.

O comprimento e composição desta região são variáveis a ser consideradas no desenhar das CARs a fim de obter o resultado clínico desejado. O domínio transmembranar também pode ser otimizado a fim de melhorar a ligação do antígeno e a transmissão de sinal das células T.

Diferentes porções da membrana foram utilizadas e derivadas de “CD3ζ, CD8α, CD28, or FcεRIγ”. In vitro, CARs que incorporem o domínio transmembranar CD3ζ conseguem formar um complexo com os TCRs endógenos, causando assim que as células T traduzidas produzam muito maiores quantidades de IFN-γ. Ao mesmo tempo, interações iônicas mediadas por resíduos carregados dentro do domínio transmembranar do CD3ζ são importantes determinantes para uma sensibilidade ao Ag ótima e ativação celular efetiva.

Apesar de tudo, ainda não foi publicada uma avaliação do domínio transmembranar CAR mais favorável e eficiente. (16)

3.1.3 Intracelular

Este é o domínio sinalizador de células T.

A ativação completa das células T precisa de dois sinais:

- 1) O envolvimento de complexos TCR/CD3 antígeno-específicos com moléculas - péptidos/MHC
- 2) Co estimulação da família TCR/CD3 na superfície das células T com os seus ligandos cognatos CD80 ou CD86, fornecidos por células apresentadoras de antígeno profissionais.

O sinal 1 já estava incluído nos designs dos CAR de 1ª Geração exclusivamente ligado a um scFv, e geralmente derivado de uma ζ -chain do complexo TCR/CD3 ou de uma γ -chain do recetor de elevada afinidade da imunoglobulina E (Fc ϵ RI).

Assim que o CAR se liga a um antígeno alvo, dá-se a fosforilação do primeiro módulo sinalizador intracelular na tirosina do seu “immune-receptor tyrosine activation motif (ITAM)”, desencadeando uma série de processos de sinalização que suportam a ativação das células T.

FG CARs (First Generation CAR) apresentam apenas o sinal 1 e descobriu-se que causam tolerância antígeno-específica, secreção de citocinas desfavorável, fraca persistência e proliferação e eventual apoptose das células T transfundidas.

Nos SG CAR (Second Generation CAR) foi incorporado o sinal 2 “(SG, e.g., CD3 ζ plus 4-1BB or CD28-signaling domains)” assim como nos TG CAR (Third Generation CARs) “(TG, e.g., CD3 ζ plus 4-1BB and CD28-signaling domains)”. **(16)**

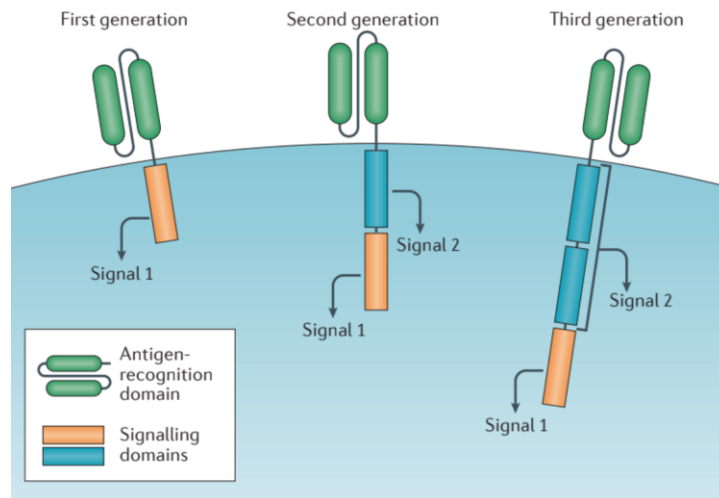


Figura 1 - |Design de Células CAR-T FG, SG, TG. Todos os designs de CAR possuem um domínio de reconhecimento de antígenos e um domínio de sinalização que ativa as células T através do sinal 1. Apenas este sinal aparece em FG CARs, nos SG CARs, já se encontra um domínio de sinalização co estimulador que também produz o sinal 2. Aos TG CARs são adicionados dois domínios de sinalização co estimuladores.(17)

Os novos produtos de CAR mediram claramente uma melhoria na produção de citocinas pela IL-2 por um processo pró-inflamatório comparado com FG CARs.

SG CAR-T19 que contém módulos sinalizadores distintos, mas que se co estimulam mostraram atividade anti tumoral impressionante em modelos pré-clínicos e ensaios clínicos para malignidades das células B.

SG CARs têm a capacidade de redirecionar a citotoxicidade da célula efetora e melhorar as suas funções e longevidade através de sinalização co estimulatória, dando, assim, capacidades supra-fisiológicas às células T que se tornam “drogas vivas” que desenvolvem comportamentos terapêuticos tanto imediatos como a longo prazo.

Um dos primeiros recetores co estimuladores adotivos foi o CD28 que é um homodímero de ligação dissulfeto de 44 kD caracterizado por um único domínio extracelular “immunoglobulin-like” variável.

Os TG CARs vieram trazer a esta tecnologia a capacidade de ter dois domínios co estimulatórios diferentes “(e.g., CD28/4-1BB or CD28/CD134)” às regiões intracelulares CD3ζ, o que tem vindo a demonstrar frequentemente que produz uma inibição mais forte do

crescimento tumoral e uma redução na morte celular induzida por ativação (AICD) do que os FG CAR e SG CAR.

Em estudos pré-clínicos, os TG CAR que contêm os endo domínios CD28-CD3ζ-CD134, mostraram secretar mais eficientemente IL-2 promovendo a expansão das células T e obrigando a um ataque citolítico anti tumoral, sem perder a especificidade, comparando com SG CARs com CD3ζ/CD28 ou CD3ζ/CD134.

É preciso ter cuidado com a tecnologia CAR pois uma ativação celular demasiado concentrada pode ser perigosa, levando a uma tempestade de citocinas e, eventualmente, à morte.(16)

3.2 Processo

Os CARs foram desenvolvidos para alterar geneticamente as células T dos doentes a fim de terem a capacidade de mediar um reconhecimento de anticorpos alvo e de fortalecer as funções das células T quando estas se ligam. Assim, as células T conseguem realizar a sua função citotóxica direcionada à doença.

Estudos clínicos de fase precoce mostram que uma expansão robusta e transfusão da população de células CAR-T pode originar um sistema imunitário permanentemente anti tumoral e induzir uma remissão duradoura em doentes com cancro.

Muitos académicos defendem que há uma interação essencial entre o domínio do anticorpo extracelular de cadeia única, região de espaçamento, domínio transmembranar e o domínio sinalizador intracelular, interação que determina a atividade CAR e para a qual não existe nenhuma configuração que sirva para tudo.

O fabrico de CAR-T de nível clínico segue os procedimentos atuais de boas práticas de produção (cGMP). Este procedimento é essencial para a implementação ampla desta nova terapêutica. Para terapias que usam células T que expressam CARs transduzidos ou recetores de células T, também são requeridos reagentes de modificação genética auxiliares de grau cGMP, tais como vetores retrovirais e lentivirais.

O processo de fabrico de CAR-Ts, engloba: colheita e processamento de células T do doente; preparação das células CAR-T; seleção e/ou ativação das células T; modificação genética com CAR cDNA; expansão em grande escala; formulação final.

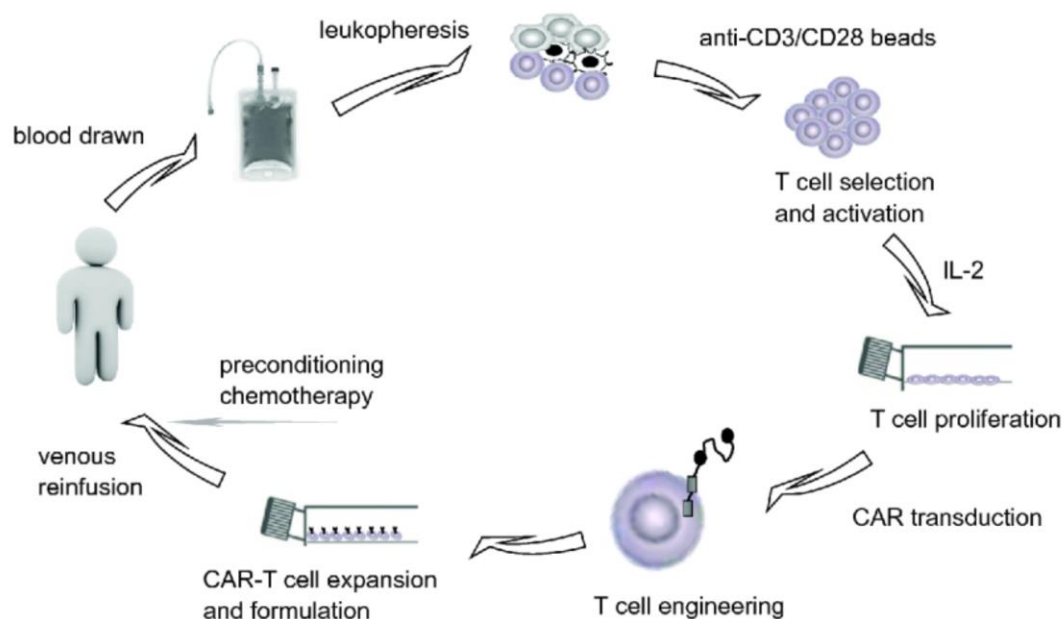


Figura 2 - Imagem esquemática de uma terapia com recetores quiméricos de antígeno.

O método de fabricação e entrega das células CAR-T envolve o isolamento e colheita de células T do doente ou de um doador alogénico, modificação genética com um CAR relevante através de transdução viral ou não viral, expansão, controlo de qualidade e re-infusão.(16)

3.2.1 Obtenção das células T

Este é o passo inicial da produção das células CAR-T em que se faz uma colheita de células mononucleares do sangue periférico do doente, normalmente feita através de um processo de leucoferese.

Estudos realizados em diferentes laboratórios revelaram que certos graus de desenvolvimento de células T como “naive”, centrais de memória ou células estaminais de memória, apresentam vantagens funcionais.

Processos de seleção clínica, transdução e expansão também foram desenvolvidos para os diferentes tipos de células T, no entanto, o tipo de célula T que produz um ótimo efeito terapêutico e toxicidade mínima, sobrevivendo a um processo de produção robusto e reprodutível ainda está para ser identificado.

O material das células T processado pode ser utilizado diretamente para um processo “downstream” ou crio preservado para uso futuro. Há prós e contras em cada uma das situações no entanto, ao crio preservar as colheitas, dá tempo para testar o produto e oferece maior flexibilidade para planear o processo de “downstream”.(18)

3.2.2 Ativação das células T

A ativação das células T necessita do sinal 1 através dos recetores das células T e um sinal co-estimulatório como o CD28, 4-1BB ou OX40 chamado de sinal 2. Estes sinais e mecanismos de ativação estão explicados no ponto 2.1.3.

A ativação destas células é necessária para a transdução do cDNA dos CAR através de vetores retrovirais. Células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas (DC), são ativadores endógenos da resposta das células T. Outro método de ativação de células T baseado em células é feito através de células artificiais apresentadoras de antígeno (AAPCs).

3.2.3 Modificar células T geneticamente

As terapias com células CAR-T atuais, dependem da expressão estável de CAR aquando da distribuição viral e não viral dos sistemas de transferência génica. Existem três tipos principais de vetores de expressão de genes estáveis usados para aplicações clínicas: vetores “ γ -retroviral”, vetores lentivirais e o sistema transposon / transposase. A expressão génica RNA mensageiro, mediada pela transferência, é um outro modo para introduzir CARs nas células, evitando a expressão a longo prazo.

Os vetores γ -retrovirais foram os primeiros vetores virais utilizados para fornecer expressão estável de CD19 CAR. São utilizados em aproximadamente um quinto de todos os ensaios clínicos que requerem entrega de transferência de genes. A característica dos vetores retrovirais é a disponibilidade de múltiplas linhas celulares de empacotamento estáveis com amplo tropismo.

Os vetores lentivirais são amplamente utilizados, pois podem transduzir células que não se dividem e exibir um perfil de integração genómica mais seguro, pelo menos no contexto de células estaminais hematopoiéticas geneticamente modificadas. Vetores lentivirais medeiam a alta eficiência de transferência de genes e dirigem o nível estável da expressão de CAR.

Transposon / transposase é um sistema relativamente recente de expressão baseado em plasmídeos. Este foi o processo utilizado para introduzir CAR anti-CD19 em células T por eletroporação. As vantagens deste sistema são ter um processo de fabrico simples, custo relativamente baixo e testes de libertação simples. A integração é aleatória, apresentando um potencial risco oncogénico secundário à mutagénese.

A transferência de RNA mensageiro (mRNA) proporciona um sistema de expressão citoplasmático que permite a expressão transitória do transgene. Ao contrário da expressão permanente e estável do transgene introduzida por transdução viral ou transfeção de DNA plasmídico, o mRNA transcrito in vitro pode ser introduzido nas células por eletroporação ou por endocitose. Não ocorrem eventos de integração genômica neste processo pelo que as preocupações de genotoxicidade e a geração potencial de retrovírus competentes para replicação são eliminadas.(18)

3.2.4 Expansão de células CAR-T

Dependendo da estratégia de modificação da célula CAR-T, existem várias plataformas de expansão disponíveis para gerar doses terapêuticas de células CAR-T (ex: fig. 3).

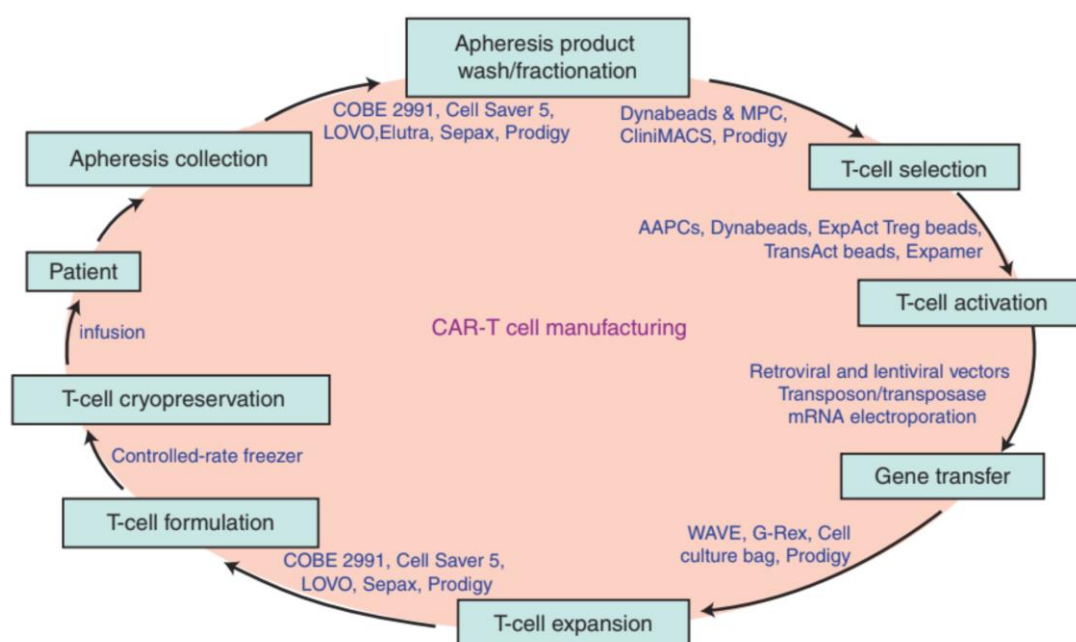


Figura 3 - Principais passos na produção de CAR-T e exemplos de tecnologias disponíveis. AAPC, artificial antigen-presenting cells; MPC, magnetic particle concentrator.(18)

Expansão de células CAR-T utilizando biorreatores GE

Este sistema escalável consiste num “Cellbag Bioreactor” de utilização única, uma base elétrica capaz de definir a temperatura e um conjunto de controlos opcionais, bombas e sondas.

Expansão de células CAR-T utilizando biorreatores G-Rex

Consiste num frasco de cultura celular com uma membrana permeável a gases na base que permite às células crescer até uma densidade alta sem comprometer as trocas de gás.

Expansão de células CAR-T utilizando um “Prodigy”

O sistema “CliniMACS Prodigy” é uma combinação de um lavador de células, o sistema de separação magnética CliniMACS e um dispositivo de cultura celular.

Expansão de células CAR-T através de estimulações AAPC recursivas.

A expansão das células CAR-T geradas através do sistema “transposon/transposase” assenta na propagação seletiva aquando da estimulação com recursiva com AAPCs γ -irradiados na presença de IL-2 e IL-21.(18)

4 Tratamentos

4.1 Fármacos Aprovados

A Agência Europeia do Medicamento (*European Medicines Agency* - EMA) recomendou alguns medicamentos para tratamento hematológicos para aprovação, tendo sido incluídas duas terapias com células T recetores de antígenos quiméricos (CAR – *Chimeric Antigen Receptor*).

Todos os medicamentos devem ser aprovados pela Comissão Europeia para que possam ser comercializados em toda a Europa. No final de junho de 2018, o Comitê de Produtos Medicinais para Uso Humano da EMA recomendou a Autorização de Introdução no Mercado (AIM) na Europa para as duas primeiras terapias com células T: Tisagenlecleucel (*Kymriah*) e Axicabtagene ciloleucel (*Yescarta*). Ambos receberam uma AIM válida em toda a União Europeia a 23 de agosto de 2018. Estes fármacos também foram aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), como também o Tocilizumab (*Actemra*). Este é usado em situações de tratamento com CAR induzidas por células T ou em casos de síndrome de libertação de citocinas (SLC) em doentes pediátricos (com idade igual ou superior a 2 anos) e em adultos.

Tisagenlecleucel pode ser autorizado para o tratamento de doentes pediátricos e de jovens adultos com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) em situação de recaída ou refratária e em doentes adultos com recaída ou Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) refratário após duas ou mais linhas de terapia sistémica. Tisagenlecleucel foi designado “medicamento órfão” em abril de 2014 para o tratamento da LLA e em outubro de 2016 para o tratamento de LDGCB, sendo que em Junho de 2016 recebeu elegibilidade para PRIME em junho de 2016 para o tratamento de LLA.(19)

Axicabtagene ciloleucel pode ser autorizado para o tratamento de Linfoma Difuso de Grandes Células B refratária e Linfoma Primário das Grandes Células B Mediastinais (LPGCBM) depois de duas ou mais linhas de terapia sistémica. Indicações similares também têm sido aprovadas para estas terapias nos Estados Unidos da América (EUA). Axicabtagene foi designado “medicamento órfão” em dezembro de 2014 para o tratamento de LDGCB e em outubro de 2015 para o tratamento do LPGCBM, sendo que em maio de 2016 recebeu elegibilidade para o PRIME para o tratamento de LDGCB.(20)

Juntamente com as recomendações de aprovação da EMA, existem medidas de gestão de risco para medir o potencial de síndrome de libertação de citocinas (SLC) para ambos os

tratamentos. Os fabricantes devem usar um registo de doentes de modo a monitorizar a segurança e eficácia do tratamento a longo prazo.

O *Kymriah*, também conhecido como CTL019, pertence à *Novartis* e foi a primeira terapia de genes modificada aprovada nos EUA. A empresa definiu o preço da terapia em 400,000€, mas tem colaborado juntamente com centros de saúde públicos para suportar o acesso, dar cobertura de seguro e só cobra aos doentes que respondem à terapia celular no primeiro mês de tratamento.(21)

Embora tenham sido feitas grandes promessas acerca desta terapia, os efeitos secundários continuam a ser uma preocupação. Os ensaios clínicos demonstraram que 49% que doentes tratados com a terapia *Novartis* CAR-T sofreram de SLC que foi responsável por várias mortes em ensaios efetuados por competidores da *Novartis* (*Kite Pharma* e *Juno Therapeutics*). (21)

Kymriah foi aprovado depois de mostrar os impressionantes resultados nos ensaios clínicos, obtendo 83% de remissão completa em doentes com LLA, os doentes sofrem de SLC (49%) mas nenhum doente tinha falecido até à data.(21)

A segunda terapia CAR-T aprovada nos EUA foi o *Yescarta*, desenvolvida pela *Kite Pharma*, que atualmente pertence à *Gilead*.(22)

O *Yescarta* foi aprovado com base nos resultados de ensaios clínicos impressionantes, considerando que o tratamento é dado a doentes que não respondem a outros tratamentos para o cancro. Após a perfusão, 72% dos doentes responderam à terapia, e 51% demonstrou uma remissão completa do cancro. Contudo, ocorreram três mortes devido aos efeitos secundários.(22)

Em relação ao *Yescarta*, apesar do preço elevadíssimo (316,000€) continua a ser mais barato (86,000€) do que o *Kymriah*.

Atualmente, o preço das terapias CAR-T continuam a ser um tema de debate, e os especialistas alertam que o custo total destes tratamentos é demasiado elevado, alcançando 1.3 milhões €/doente, tendo em conta a necessidade de hospitalização e cuidados intensivos no caso de efeitos secundários poderem advir da terapia.(22)

Contudo, várias companhias têm começado a trabalhar numa nova versão de terapia que poderá reduzir, significativamente, os custos. Como é o exemplo da *Collectis*, uma empresa de biotecnologia francesa que é pioneira no desenvolvimento na terapia CAR-T alogénica, onde as células são derivadas de um doador e não necessitam de um processo de produção individualizado.(22)

4.2 Caraterísticas do Tisagenlecleucel e do Axicabtagene ciloleucel

Kymriah é uma imunoterapia celular que contém Tisagenlecleucel, células T autólogas geneticamente modificadas que utilizam um vetor lentiviral que codifica para um recetor do antígeno quimérico anti-CD19.(19)

A concentração de células CAR-T viáveis positivas depende da indicação e do peso corporal do doente (1-3 sacos de perfusão que contém um total de $1,2 \times 10^6$ - 6×10^8 células CAR-T viáveis).

Na sua composição estão incluídos os seguintes excipientes: Glicose, Cloreto de sódio, Solução de albumina humana, Dextran 40 injetável, Dimetilsulfóxido, Gluconato de sódio, Acetato de sódio, Cloreto de potássio, Cloreto de magnésio, Sódio-N-acetil triptofano, Caprilato de sódio, Alumínio, Água para preparações injetáveis.(19)

O prazo de validade é de 9 meses. Deve ser armazenado e transportado a temperaturas de -120°C . Quando o produto for necessário, deve-se proceder ao descongelamento, e deve ser mantido à temperatura ambiente (20° - 25°C) e administrado durante 30 minutos de modo a manter a sua viabilidade máxima.(19)

Yescarta são células T autólogas geneticamente modificadas direcionada para CD19. Cada saco único de perfusão é específico para o doente e este contém uma dispersão de células CAR-T anti-CD19 num volume de aproximadamente 68 mL para uma dose alvo de 2×10^6 células CAR-T viáveis anti-CD19 positivas/kg de peso corporal, com um máximo de 2×10^8 células CAR-T anti CD19. Além das células, contém Cryostor CS10, cloreto de sódio e albumina humana como excipientes. Esta perfusão é administrada por via intravenosa e o tempo total da infusão não deve exceder os 30 minutos.(20)

Yescarta é estável durante 1 ano quando é armazenado congelado na fase de vapor de azoto líquido ($\leq -150^{\circ}\text{C}$). A sua estabilidade após o fim do descongelamento é até 3h à temperatura ambiente (20° - 25°C). Outro aspeto a ter em conta é a irradiação, pois pode levar à inativação do produto.(20)

4.2.1 Procedimentos para administração de YESCARTA e Posologia

Embora não existam diretrizes para a utilização desta terapia, é possível através da informação do produto fornecida pela EMA indicar o modo de administração e a sua posologia.

A terapia deverá ser iniciada sob orientação e supervisão de um profissional de saúde com experiência no tratamento de tumores hematológicos e treinado para a administração e gestão dos doentes tratados com *Yescarta*.

Devido ao risco associado a esta terapia, o tratamento não deverá ser administrado no caso de o doente apresentar pelo menos uma das seguintes condições:

- Reações adversas sérias não resolvidas (em especial, reações pulmonares, cardíacas ou hipotensão) incluindo a quimioterapias anteriores;
- Infecções ativas não controladas;
- Doença do Hospedeiro vs enxerto ativa.

Quando o historial clínico e tratamentos anteriores do doente são conhecidos, é tomada a decisão de se iniciar o tratamento com as células CAR-T, em que no momento da sua administração deve estar à disposição todo o equipamento de emergência, assim como o Tocilizumab (mínimo 4 doses) para ser usado caso ocorra um evento de SLC após a perfusão. Existem três etapas para se proceder ao tratamento:

Fase pré-tratamento - consiste na depleção linfocítica. Os regimes aplicados consistem na administração i.v. de ciclofosfamida 500 mg/m² e também de fludarabina 30 mg/m², no 3º, 4º e 5º dia antes da perfusão das células CAR-T.

Fase Pré-medicação - é recomendado a toma de paracetamol 500-1000 mg per os e 12,5 mg de difenildramina i.v. ou oral, 1 hora antes da perfusão.

Não é recomendado o uso profilático de corticosteroides sistêmicos pois pode interferir com a atividade do produto.

É administrado uma dose única de YESCARTA que contém 2x10⁶ células CAR-T/kg num meio disperso de 68mL num saco para perfusão.

Fase Monitorização - os doentes têm de ser monitorizados, diariamente nos 10 dias seguintes à perfusão, para verificar sinais e sintomas de SLC, problemas neurológicos ou outras toxicidades. Após estes dias o doente deve ser informado que deve permanecer no hospital ou clínica qualificada pelo menos durante 4 semanas. (23)

4.2.2 Efeitos Indesejáveis

Os efeitos mais sérios e frequentes que ocorrem são o SLC (93%), encefalopatia (58%) e infeções (38%).

Os sinais e sintomas mais comuns associados ao SLC são a pirexia (76%), hipotensão (41%), hipoxia (21%), taquicardia (21%) e arrepios (19%). As reações adversas graves que

podem estar associadas ao SLC incluem lesão renal, taquicardia ventricular, paragem cardíaca, falência cardíaca entre outros (Tabela 1).

Os sinais e sintomas mais comuns associados a reações adversas neurológicas incluem encefalopatia (58%), tremor (31%), afasia (18%) e delírios (17%).

Os locais mais comuns de infeções são no trato respiratório, que em caso de alguma eventualidade se verificar neutropenia deve ser efetuada uma avaliação e gestão da infeção através da administração de antibióticos de largo espectro, fluidos ou quaisquer outros cuidados médicos. (23)

De acordo com a Tabela 2 é possível realizar a avaliação do grau e a ocorrência ou não de reações adversas neurológicas e como tomar as devidas providências.

Tabela 1 - Diretrizes para a gestão e grau de SCL(23)

| CRS Grade (a) | Tocilizumab | Steroids |
|---|---|--|
| Grade 1 Symptoms require symptomatic treatment only (e.g., fever, nausea, fatigue, headache, myalgia, malaise). | N/A | N/A |
| Grade 2 Symptoms require and respond to moderate intervention. Oxygen requirement less than 40% FiO ₂ or hypotension responsive to fluids or low dose of one vasopressor or Grade 2 organ toxicity (b). | Administer tocilizumab (c) 8 mg/kg intravenously over 1 hour (not to exceed 800 mg). Repeat tocilizumab every 8 hours as needed if not responsive to intravenous fluids or increasing supplemental oxygen. Limit to a maximum of 3 doses in a 24 hour period; maximum total of 4 doses if no clinical improvement in the signs and symptoms of CRS. | Manage per Grade 3 if no improvement within 24 hours after starting tocilizumab. |
| Grade 3 Symptoms require and respond to aggressive intervention. Oxygen requirement greater than or equal to 40% FiO ₂ or hypotension requiring high-dose or multiple vasopressors or Grade 3 organ toxicity or Grade 4 transaminitis. | Per Grade 2 | Administer methylprednisolone 1 mg/kg intravenously twice daily or equivalent dexamethasone (e.g., 10 mg intravenously every 6 hours). Continue corticosteroids use until the event is Grade 1 or less, then taper over 3 days. If not improving, manage as Grade 4 (below). |
| Grade 4 Life-threatening symptoms. Requirements for ventilator support or continuous veno-venous haemodialysis (CVVHD) or Grade 4 organ toxicity (excluding transaminitis). | Per Grade 2 | Administer methylprednisolone 1000 mg intravenously per day for 3 days; if improves, then manage as above. Consider alternate immunosuppressants if no improvement or if condition worsens. |

N/A = not available/not applicable
(a) Lee et al 2014
(b) Refer to Table 2 for management of neurologic adverse reactions
(c) Refer to tocilizumab summary of product characteristics for details

Tabela 2 - Diretrizes da avaliação e das reações adversas neurológicas(23)

| Grading Assessment | Concurrent CRS | No Concurrent CRS |
|--------------------|---|--|
| Grade 2 | Administer tocilizumab per Table 1 for management of Grade 2 CRS. If no improvement within 24 hours after starting tocilizumab, administer dexamethasone 10 mg intravenously every 6 hours if not already taking other corticosteroids. Continue dexamethasone use until the event is Grade 1 or less, then taper over 3 days. | Administer dexamethasone 10 mg intravenously every 6 hours. Continue dexamethasone use until the event is Grade 1 or less, then taper over 3 days. |
| | Consider non-sedating, anti-seizure medicines (e.g., levetiracetam) for seizure prophylaxis. | |
| Grade 3 | Administer tocilizumab per Table 1 for management of Grade 2 CRS. In addition, administer dexamethasone 10 mg intravenously with the first dose of tocilizumab and repeat dose every 6 hours. Continue dexamethasone use until the event is Grade 1 or less, then taper over 3 days. | Administer dexamethasone 10 mg intravenously every 6 hours. Continue dexamethasone use until the event is Grade 1 or less, then taper over 3 days. |
| | Consider non-sedating, anti-seizure medicines (e.g., levetiracetam) for seizure prophylaxis. | |
| Grade 4 | Administer tocilizumab per Table 1 for management of Grade 2 CRS. Administer methylprednisolone 1000 mg intravenously per day with first dose of tocilizumab and continue methylprednisolone 1000 mg intravenously per day for 2 more days; if improves, then manage as above. | Administer methylprednisolone 1000 mg intravenously per day for 3 days; if improves, then manage as above. |
| | Consider non-sedating, anti-seizure medicines (e.g., levetiracetam) for seizure prophylaxis. | |

4.2.3 Procedimentos para administração de KYMRIA® e Posologia

Para este produto, tal como aconteceu para o YESCARTA, também ainda não existem diretrizes que se possam seguir, apenas informação dada pela EMA sobre o modo de administração e posologia. Como anteriormente, existem riscos associados ao tratamento com Kymria® e deve-se ter em consideração o estado do doente. O tratamento não deve ser dado a doentes nas seguintes condições:

- Reações adversas graves não resolvidas (em especial, reação a nível pulmonar, cardíaco ou hipotensão) de regimes de quimioterapia anteriores;
- Infecção ativa não controlada;
- Doença do enxerto vs hospedeiro ativa;
- Deterioramento do estado clínico da leucemia ou linfoma após a depleção linfocítica.

Em relação à posologia existem diferenças, dependendo da idade do doente e da patologia a tratar.

Dose para doentes pediátricos e jovens adultos com LLA: peso ≤ 50 kg \rightarrow 0,2 a 5×10^6 células T/kg; peso ≥ 50 kg \rightarrow 0,1 a $2,5 \times 10^8$ células T, não baseado no peso.

Dose em doentes adultos com LDGCB: 0,6 a 6×10^8 células T

Etapas do tratamento:

Fase do Pré-tratamento - depleção linfocítica

Os regimes recomendados para tratamento da LLA são: Fludarabina 30mg/m² (diariamente durante 4 dias) + ciclofosfamida 500mg/m² (diariamente durante 2 dias a começar na primeira dose de fludarabina).

Os regimes recomendados para o tratamento de LDGCB são: Fludarabina com uma dose de 25 mg/m² (diariamente durante 3 dias) + ciclofosfamida com dose de 250 mg/m² (diariamente durante 3 dias a começar na primeira dose de fludarabina).

A administração de Kymriah só pode ocorrer após 2 a 14 dias da imunossupressão.

Fase de Pré-medicação - para minimizar reações durante a perfusão, é recomendada a toma de paracetamol e difenidramina ou outro anti-histamínico 30 a 60 minutos antes da perfusão.

Fase de monitorização - doentes devem ser monitorizados nos primeiros 10 dias para verificar sinais e sintomas de SLC, problemas neurológicos e outras toxicidades. Devem ser informados da importância de permanecerem em clínicas especializadas durante 4 semanas após a perfusão. (24)

4.2.4 Efeitos Indesejáveis

A reações adversas mais comuns no tratamento de LLA são SLC (77%), infeções (65%), hipogamaglobulinemia (47%), pirexia (40%) e diminuição do apetite (39%). No caso do tratamento de LDGCB as reações adversas mais comuns são SLC (58%), infeções (54%), pirexia (35%), diarreia (32%), náuseas (29%), hipotensão (26%) e fadiga (26%).

As reações adversas neurológicas, em particular a encefalopatia, estado confuso ou delírio ocorrem frequentemente com o tratamento com Kymriah e podem ser graves ou fatais. Os doentes devem ser vigiados durante e após o tratamento e verificar algum estado de infeção, quantificação dos níveis de imunoglobulinas, pois níveis baixos, em doentes que alcançaram a remissão completa, podem aumentar o risco de infeção.

Em situações de SLC os sintomas manifestam-se através de febres altas, rigidez, mialgias, artralgia, náuseas, vômitos, diarreia, diaforese, erupção cutânea, anorexia, fadiga, cefaleias, hipotensão, dispneia, taquipneia, encefalopatia e hipoxia. Em alguns casos, coagulação intravascular disseminada (CID), baixos níveis de fibrinogénio, síndrome de vazamento capilar (SVC) e síndrome de ativação macrófaga/ hemofagocítica linfocítica (SAM/HLH). (24)

A gestão de SLC associado ao tratamento com *Kymriah* é feita com base no algoritmo apresentado na tabela 3.

Tabela 3 - Algoritmo para a gestão de SLC(24)

| Cytokine release syndrome severity | Management |
|---|---|
| <i>Prodromal syndrome:</i> Low-grade fever, fatigue, anorexia | Observe in person; exclude infection; administer antibiotics per local guidelines if neutropenic; provide symptomatic support. |
| <i>Cytokine release syndrome requiring mild intervention - one or more of the following:</i> <ul style="list-style-type: none"> – High fever – Hypoxia – Mild hypotension | Administer antipyretics, oxygen, intravenous fluids and/or low-dose vasopressors as needed. |
| <i>Cytokine release syndrome requiring moderate to aggressive intervention - one or more of the following:</i> <ul style="list-style-type: none"> – Haemodynamic instability despite intravenous fluids and vasopressor support – Worsening respiratory distress, including pulmonary infiltrates, increasing oxygen requirement including high-flow oxygen and/or need for mechanical ventilation – Rapid clinical deterioration | <ul style="list-style-type: none"> • Administer high-dose or multiple vasopressors, oxygen, mechanical ventilation and/or other supportive care as needed. • Administer tocilizumab. <ul style="list-style-type: none"> - Patient weight less than 30 kg: 12 mg/kg intravenously over 1 hour - Patient weight ≥ 30 kg: 8 mg/kg intravenously over 1 hour (maximum dose 800 mg) <p>Repeat tocilizumab as needed at a minimum interval of 8 hours if there is no clinical improvement.</p> <p>If no response to second dose of tocilizumab, consider a third dose of tocilizumab or pursue alternative measures for treatment of cytokine release syndrome.</p> <p>Limit to a maximum total of 4 tocilizumab doses.</p> <ul style="list-style-type: none"> • If no clinical improvement within 12 to 18 hours of the first tocilizumab dose, or worsening at any time, administer methylprednisolone 2 mg/kg as an initial dose, then 2 mg/kg per day until vasopressors and high-flow oxygen are no longer needed, then taper. |

4.3 Tocilizumab (RoActemra)

O Tocilizumab é um anticorpo monoclonal, concebido para reconhecer e ligar-se a um alvo específico no organismo. A ligação ocorre pelo recetor através de uma molécula mensageira (citocina) chamada Interleucina 6. Esta molécula está relacionada com a inflamação e existe em doentes com artrite reumatoide, artrite idiopática juvenil entre outros, em níveis elevados. Ao impedir que a IL-6 se ligue aos recetores, o tocilizumab reduz a inflamação e outros sintomas relacionados com a patologia.

O RoActemra é administrado por infusão e foi considerado eficaz no tratamento do Síndrome de Libertação de Citocinas (SLC) grave. O principal parâmetro de eficácia baseou-se no número de doentes com SLC que conseguiu reverter a situação após 14 dias da toma de RoActemra. Dos 51 doentes com SLC após terapia com Tisagenlecleucel, 39 responderam ao tratamento com RoActemra (76,55), enquanto que 8 dos 15 doentes (53,3%) com SLC após terapia com Axicabtagene cicloreucel responderam. (25)

4.4 Diretrizes de gestão de doentes pediátricos que receberam terapia CAR-T

Foi através de um conjunto de especialistas do subgrupo da Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) da Pediatric Acute Injury and Sepsis Investigators (PALISI), o Programa do Centro de Cancro da Universidade de Texas MD - CAR-T Cell Therapy-Associated Toxicity (CARTOX) e muitas outras instituições que foram desenvolvidas guidelines para o tratamento com células CAR-T.

O objetivo primordial é fornecer guidelines abrangentes para a administração segura de várias terapias com células CAR-T, o reconhecimento precoce do SLC e/ou Síndrome de encefalopatia relacionada com células CAR-T (SERC) e a gestão de risco da toxicidade das mesmas. (26)

Os níveis de evidência e força das recomendações foram baseados em esquemas de Classificação descritos por Shelle (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo das principais recomendações para o uso da terapia celular CAR-T(26)

| Recommendations | Level of evidence | Grade |
|--|-------------------|-------|
| Providers are encouraged to adhere to product information labels and guidance from REMS programmes as they are approved by the FDA ⁶ | IV | D |
| Patient selection should be based upon the indications approved by the FDA and the criteria used in pivotal studies and can be tailored on the basis of emerging information from each new product ^{6,3,49} | IV | D |
| Consent should include descriptions of the risks and benefits associated with leukapheresis, lymphodepletion, CRS, CRES, bridging chemotherapy, intensive-care support (mechanical ventilation, dialysis, and inotropic support), and anti-IL-6 therapy ³⁸ | IIA | B |
| When appropriate, child assent should also be obtained; age-appropriate advance directives should be considered. Incorporation of child life and psychological services in assent discussions can be helpful ⁴⁴ | IV | D |
| Paediatric patients can require a leukapheresis catheter for cell collection. Close monitoring for hypotension, hypocalcaemia, and catheter-related pain is imperative during paediatric leukapheresis, particularly among infants and younger children who might not verbalize symptoms ^{17,48} | IIA | B |
| We recommend the selection of cyclophosphamide–fludarabine regimens for lymphodepletion, with exceptions considered in cases of haemorrhagic cystitis and/or resistance to a prior cyclophosphamide-based regimen ^{2,466,4,78–81} | IIA | B |
| Given the potential for rapid clinical deterioration, if CAR T cell therapy is administered in an outpatient setting, a low threshold should be set for patient admission upon the development of a fever and/or signs or symptoms that are suggestive of CRS and/or CRES ³⁸ | IIA | B |
| On the basis of the published experience for tisagenlecleucel in paediatric and young adult patients with CD19 ⁺ relapsed and/or refractory B cell acute lymphoblastic leukaemia, considering inpatient admission for a minimum of 3–7 days following infusion is reasonable ^{6,38} | IIA | B |
| CRS grading should be performed as outlined in TABLE 2 at least once every 12 hours and more often if a change is noted and/or concerns exist ³⁷ | IIA | B |
| Parent and/or caregiver concerns should be addressed because early signs or symptoms of CRS can be subtle and best recognized by those who know the child best ²⁸ | III | C |
| CRS should be suspected if at least one of the following four symptoms or signs is present during the CRS-risk period within the first 2 weeks following CAR T cell infusion: fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$; hypotension (for patients aged 1–10 years: systolic blood pressure $< (70 + (2 \times \text{age in years}))$ mmHg; for those aged > 10 years: SBP < 90 mmHg); a change from baseline and/or reduced requirements for chronic anti-hypertensive medications; hypoxia with an arterial oxygen saturation of $< 90\%$ on room air; or evidence of organ toxicity as determined by the most recent CTCAE grading system (version 5.0) ⁶⁰ and paediatric considerations as outlined in TABLE 2 (REFS ^{29,37,82}) | IIA | C |
| High vigilance for sinus tachycardia as an early sign of CRS is recommended (on the basis of age-specific normal range or baseline values) ^{103,104} | IIA | B |
| We recommend application of the PALICC at-risk P-ARDS criteria for the CRS grading of hypoxia ^{100–102} | IIA | B |
| Acute kidney injury in children can be graded according to CTCAE using pRIFLE and KDIGO definitions of oliguria ^{105,106} | IIA | B |
| Tocilizumab paediatric dosing: patients weighing < 30 kg are dosed at 12 mg/kg, and those weighing ≥ 30 kg are dosed at 8 mg/kg (REF. ¹⁰⁹) | IIA | B |
| CAR T cell-related HLH and/or MAS have been shown to resolve following administration of anti-IL-6 therapy and corticosteroids, although refractory cases can require further therapy, including consideration of systemic and/or intrathecal therapy on the basis of HLH-2004 management guidelines or use of the IL-1 receptor antagonist anakinra; further research is needed in this area ^{62,113,114} | IIA | C |
| We recommend that delirium screening using the CAPD tool ¹¹⁶ (or the CARTOX-10 grading system ³⁷ for patients aged ≥ 12 years who have sufficient cognitive abilities) be performed at least twice per 24-hour period among admitted patients and at least daily among outpatients during the high-risk periods for CRES | IIA | C |
| Consideration should be given to a prospective collaboration with intensive-care registries, such as VPS, which could allow accurate data entry of cell-therapy variables into the CIBMTR registry (by cell-therapy programmes) with concurrent entry of intensive-care variables into an appropriate registry by paediatric critical care teams | IV | D |
| We strongly encourage consideration of QALYs for paediatric patients who might achieve long-term remission through this therapy and encourage all efforts to reduce the cost of care ^{136–140} | IV | D |
| We recommend that CAR T cell programmes seek FACT IEC accreditation as a voluntary means of ensuring adherence to quality standards ³³ | IV | D |

Levels and grades of evidence have been assigned on the basis of the definitions proposed by Shekelle et al.⁴⁹ (see Supplementary Table 1 for details). CAPD, Cornell Assessment of Pediatric Delirium; CAR, chimeric antigen receptor; CARTOX-10, CAR T Cell Therapy-Associated Toxicity 10-point assessment scale; CIBMTR, Center for International Blood and Marrow Transplant Research; CRES, CAR T cell-related encephalopathy syndrome; CRS, cytokine-release syndrome; CTCAE, Common Terminology Criteria for Adverse Events; FACT, Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy; HLH, haemophagocytic lymphohistiocytosis; IEC, immune effector cell; KDIGO, Kidney Disease: Improving Global Outcomes; MAS, macrophage-activation syndrome; P-ARDS, paediatric acute respiratory distress syndrome; PALICC, Pediatric Acute Lung Injury Consensus Conference; pRIFLE, Pediatric Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage Renal Disease; QALYs, quality-adjusted life years; REMS, risk evaluation and mitigation strategy; SBP, systolic blood pressure; VPS, virtual paediatric intensive-care unit (PICU) Systems.

4.4.1 Avaliação e Seleção do Doente

Atualmente, as terapias com células CAR-T são usadas em doentes com cânceres hematológicos com recidivas ou refratários ou malignidades de alto risco.

A seleção de doentes deve-se basear nas indicações aprovadas pela FDA e nos critérios de elegibilidade em estudos cruciais, mas poderia ser adaptada com base em informações ocorrentes relacionadas a cada novo produto.

Os doentes devem ter um perfil de desempenho aceitável de acordo com os limites definidos nos protocolos de tratamento e/ou diretrizes institucionais, que podem variar para diferentes indicações e produtos e, dependendo de qualquer deficiência, são secundárias às manifestações específicas da doença e, assim, é possível melhorar a resposta da doença primária.

Os doentes selecionados devem cumprir os seguintes tópicos:

- ❖ Não devem ter evidência de infecções não controladas ou Doença do enxerto vs hospedeiro ativa (DEVH);
- ❖ Não ter recebido, recentemente, uma terapia com infusão de linfócitos de um dador;
- ❖ Não devem receber imunossupressão antes da leucaferese autogénica se tiverem recebido previamente imunossupressão para o transplante alogénico de células estaminais;
- ❖ Contagem de linfócitos > 100 células/ μ L é aceitável, mas contagens > 500 células/ μ L são preferíveis (depende das diretrizes dadas pelo fabricante).

Casos de doentes com infecções não controladas e DEVH aguda de grau II-IV ou crónica devem ser excluídos.

Doentes com patologias do SNC ativas devem ser selecionados com precaução, em particular para produtos associados ao SERCS.

Deve ser realizado um rastreio de doenças infecciosas (por exemplo, para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBv), anticorpos anti-HBv core, anticorpos antivírus da hepatite C (ac anti-HCv) e anticorpos anti-Hiv-1 e 2). (26)

4.4.2 Consentimento informado

Por ser um tratamento associado a toxicidades que é potencialmente fatal e de exigir avaliações e restrições de acompanhamento de longo-prazo é importante que seja obtido um consentimento informado detalhado do doente e/ou dos responsáveis e, quando apropriado, o consentimento da criança.

Também devem ser informados sobre os benefícios da terapia com células CAR-T como outros riscos associados ao procedimento. O consentimento para a produção de células CAR-T e terapia deve incluir a fase de leucoferese, depleção linfocítica, SLC e SERC e a administração de quimioterapia, cuidados intensivos (intubação, ventilação mecânica, suporte vaso pressor (aumento da pressão sanguínea) e/ou inotrópico, terapia de substituição renal e risco de hipertensão intracraniana) e terapia com interleucina 6 (IL-6).

Os doentes devem também estar conscientes que mesmo que a produção das células CAR-T seja efetuada com sucesso, a perfusão de células no doente depende da avaliação clínica contínua. Deverão informados da necessidade de permanecerem nas instalações de tratamento após infusão para monitorização.

Esta monitorização é realizada através do exame físico e historial diário; análises clínicas diárias (hemograma, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, fibrinogénio, D-Dímeros, níveis de magnésio, fósforo, ácido úrico, lactato desidrogenase, ALT, aspartato aminotransferase (AST), albumina, bilirrubinas, Proteína C Reativa, ferritina; verificar o perfil de SLC e SERC a cada 12h ou com maior frequência caso haja alguma alteração clínica; assegurar que a terapia com IL-6 está disponível para ser administrada, e igualmente, tratamento profilático para as convulsões (Levetiracetam a cada 12h durante 30 dias após a perfusão). Além de todos estes parâmetros tem de existir uma monitorização da toxicidade dos órgãos (de acordo com Critérios Comuns de Terminologia para efeitos adversos) (26)

4.4.3 Preparação para o tratamento de depleção linfocítica

Os regimes de depleção linfocítica mais comuns usados no tratamento em doentes pediátricos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Regimes de depleção linfocítica em doentes pediátricos(26)

| |
|--|
| <p>Cyclophosphamide plus fludarabine</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cyclophosphamide 900 mg/m² (single dose) and fludarabine 25 mg/m² daily for 3 days²² • Cyclophosphamide 30–60 mg/kg (single dose) and fludarabine 25 mg/m² daily for 3 days⁶⁴ • Cyclophosphamide 30–60 mg/kg (single dose) and fludarabine 25 mg/m² daily for 5 days⁶⁴ • Cyclophosphamide 500 mg/m² daily for 2 days and fludarabine 30 mg/m² daily for 4 days⁹ • Cyclophosphamide 300 mg/m² daily for 3 days and fludarabine 30 mg/m² daily for 3 days⁹ <p>Cyclophosphamide plus etoposide</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cyclophosphamide 440 mg/m² daily for 2 days and etoposide 100 mg/m² daily for 2 days⁹ • Cyclophosphamide 2–4 g/m² (single dose) and etoposide 100 mg/m² daily for 3 days⁶⁴ <p>CVAD A</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cyclophosphamide 300 mg/m² every 12 hours on days 1–3, vincristine 1.5 mg/m² (maximum 2 mg) on day 3, and adriamycin 50 mg/m² on day 3 (REF.⁹) <p>CVAD B</p> <ul style="list-style-type: none"> • Methotrexate 1 g/m² on day 1 and cytarabine 1 g/m² every 12 hours on days 2 and 3 (REF.⁹) <p>Cytarabine plus etoposide</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cytarabine 300 mg/m² (single dose) and etoposide 150 mg/m² (single dose)⁹ <p>Cyclophosphamide monotherapy</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2–4 g/m² (single dose)⁶⁴ • 1 g/m² (single dose)⁹ • 300 mg/m² every 12 hours for 3 days⁹ <p>Clofarabine</p> <ul style="list-style-type: none"> • 30 mg/m² daily for 5 days⁹ |
|--|

A imunossupressão pode ser favorável para a transferência de células CAR-T devido à reduzida competição por fatores homeostáticos. A remoção de “cytokine sinks”, aumenta a disponibilidade de citocinas que promovem a proliferação e a sobrevivência de linfócitos, como IL-7 e IL-15. Tal pode ser um fator que contribui para a eficácia das células T específicas. Além disso, a depleção de células reguladoras CD4+ e CD25+ imunossupressoras tem sido proposta como um mecanismo de explicação através do qual a depleção linfocítica aumenta a terapia CAR-T. A imunossupressão também revelou melhorar a expansão e persistência das células CAR-T.

É de frisar que a maioria dos doentes pediátricos incluídos nos ensaios com Tisagenlecleucel iniciou e completou a depleção linfocítica antes da administração do produto. Deste modo, é recomendado nestas diretrizes que todos os doentes sejam submetidos

a um regime de imunossupressão. O regime mais comum utilizado é a ciclofosfamida em combinação com fludarabina. (26)

4.4.4 Administração das células

Tal como enunciado acima, os doentes devem estar nas condições certas para a administração das células. No momento da administração das células CAR-T é necessário que todo o equipamento de emergência esteja disponível, no caso de algum sintoma indesejado possa ocorrer.

É explicado tanto ao doente como ao cuidador os sintomas que devem ser verificados, desde falta de ar, erupção cutânea, calafrios e dores no peito ou nas costas.

É dado previamente, cerca de 30 a 60 minutos antes da perfusão das células, acetaminofeno e difenidramina para evitar reações causadas com o armazenamento das células (ex: dimetilsulfóxido) (Fase Pré-medicação).

Após a perfusão, os sinais vitais e a produção de urina devem ser monitorizados regularmente. Algumas das reações adversas incluem náusea, vômitos, dor abdominal, arrepios, febre. Raramente, depressão respiratória grave, neurotoxicidade e arritmias cardíacas. (26)

4.4.5 Gestão, Classificação e Monitorização do SLC

O SLC consiste numa resposta inflamatória sistêmica causada pela secreção rápida e excessiva de citocinas e está relacionada com um conjunto de sintomas desde febre a falha múltipla de órgãos.

No ensaio ELIANA, 77% da população (doentes pediátricos e jovens adultos) desenvolveram SLC com o tratamento com Tisagenlecleucel, observando-se que a maioria teve sintomas graves tendo-se recorrido a cuidados intensivos. Além disso, 40% dos doentes desenvolveram SERC, cerca de 43% teve infeção, neutropenia e trombocitopenia.

A deteção precoce de SLC e/ou SERC em doentes pediátricos é um desafio. Contudo, se for efetuado um diagnóstico e gestão precoce destas situações, pode-se diminuir o risco de vida. A classificação e gestão do SLC foram baseados em critérios delineados por Lee e os seus colegas (Tabela 6).

A suspeita de SLC pode ser realizada se pelo menos um dos quatro sintomas ou sinais estão presentes durante o período de tempo após a perfusão com as células: febre (≥ 38 °C), hipotensão, hipoxia ou evidência de toxicidade nos órgãos. (26)

Tabela 6 - Classificação e Gestão do SLC(26)

| Grade 1 CRS | Grade 2 CRS | Grade 3 CRS | Grade 4 CRS |
|---|--|--|--|
| <i>Signs and symptoms</i> | | | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$ • No hypotension • No hypoxia • Grade ≤ 1 organ toxicity^a | Any temperature and any of the following: <ul style="list-style-type: none"> • Hypotension that responds to i.v. fluids or low-dose vasopressor treatment • SpO_2 $< 90\%$ on room air: FiO_2 requirement $< 40\%$ to keep SpO_2 $> 88\%$ • Grade 2 organ toxicity^a | Any temperature and any of the following: <ul style="list-style-type: none"> • Hypotension (age 1–10 years: $\text{SBP} < (70 + (2 \times \text{age in years}))$ mmHg; age > 10 years: $\text{SBP} < 90$ mmHg) requiring high-dose or multiple vasopressors • FiO_2 requirement $\geq 40\%$ and/or requiring BiPAP to keep SpO_2 $> 88\%$ • Grade 3 organ toxicity^a • Grade 4 transaminitis ($> 20 \times \text{ULN}$) | Any temperature and any of the following: <ul style="list-style-type: none"> • Persistent hypotension despite fluid resuscitation and treatment with multiple vasopressors • Requirement for invasive mechanical ventilation • Grade 4 organ toxicity^a (except grade 4 transaminitis) |
| <i>Paediatric considerations</i> | | | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Asymptomatic sinus tachycardia is defined by heart rates above the age-specific normal range or baseline values) | <ul style="list-style-type: none"> • Hypotension is defined as follows: $\text{SBP} < (70 + (2 \times \text{age in years}))$ mmHg in patients aged 1–10 years; $\text{SBP} < 90$ mmHg in patients aged > 10 years | <ul style="list-style-type: none"> • Oliguria is defined as a urine output of < 0.5 ml/kg per hour for 8 hours | <ul style="list-style-type: none"> • Anuria is defined as a urine output of < 0.3 ml/kg per hour for 24 hours or 0 ml/kg per hour for 12 hours |
| <i>Management</i> | | | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Acetaminophen, as needed, for fever • Evaluate for infectious aetiologies (blood and urine cultures and chest radiography) • Consider broad-spectrum antibiotics and filgrastim (if patient is neutropenic) • Assess for adequate hydration • Consider anti-IL-6 therapy for persistent or refractory fever^b • Symptomatic management of constitutional symptoms and organ toxicities | <ul style="list-style-type: none"> • Manage according to recommendations for grade 1 CRS (if applicable) • Administer i.v. fluid bolus of 10–20 ml/kg normal saline; repeat as necessary to maintain SBP above baseline or age-specific normal range • For hypotension refractory to fluid boluses or hypoxia, consider anti-IL-6 therapy with i.v. tocilizumab (12 mg/kg for patients weighing < 30 kg or 8 mg/kg for those weighing ≥ 30 kg, to a maximum of 800 mg per dose); repeat dose every 8 hours for up to 3 doses within 24 hours (but titrate frequency according to response) • If hypotension persists after two fluid boluses and anti-IL-6 therapy, start vasopressors, transfer patient to PICU, and obtain echocardiogram • Use supplemental oxygen as needed • If patient is at high risk of severe CRS^c, hypotension persists after anti-IL-6 therapy, or there are signs of hypoperfusion or rapid deterioration, use stress-dose hydrocortisone (12.5–25 mg/m² per day divided every 6 hours; i.v. dexamethasone 0.5 mg/kg (maximum 10 mg per dose) every 6 hours; or methylprednisolone 1–2 mg/kg per day divided every 6–12 hours) | <ul style="list-style-type: none"> • Manage according to recommendations for grades 1 and 2 CRS • Transfer patient to PICU and obtain echocardiogram, if not performed already • Administer i.v. dexamethasone 0.5 mg/kg (maximum 10 mg per dose) every 6 hours; can increase dose to maximum of 20 mg every 6 hours if patient is refractory to lower dose (alternatively, methylprednisolone 1–2 mg/kg per day divided every 6–12 hours can be used)^d • Use supplemental oxygen, including high-flow oxygen delivery and non-invasive positive pressure ventilation | <ul style="list-style-type: none"> • Administer i.v. fluids, anti-IL-6 therapy, corticosteroids, and vasopressors and perform haemodynamic monitoring as described for grades 1, 2, or 3 CRS • If low doses of corticosteroids do not lead to clinical improvement, consider high-dose methylprednisolone (1 g daily for 3 days followed by rapid taper on the basis of clinical response) |

^a For presentation of systemic adverse events (SAEs) and management recommendations for each grade, see Table 1. ^b For management of CRS, see Table 1. ^c For management of CRS, see Table 1. ^d For management of CRS, see Table 1.

4.4.6 SERC

Os sintomas neurológicos associados à terapia com as células CAR-T, referente ao SERC, estão presentes como encefalopatia tóxica com delírios, tonturas e/ou edema cerebral. Os sinais e sintomas precoces de SERC podem ser subtis nas crianças, é preciso um conjunto de capacidades para determinar o nível base do desempenho cognitivo da criança. No caso dos adultos, quando apresentam sintomas precoces de SERC incluem falta de atenção, distúrbios na linguagem e caligrafia. O SERC pode surgir como uma complicação tardia e em alguns casos após a alta do hospital, mas o doente ou os seus cuidadores são informados de diretrizes apropriadas aquando da saída do hospital. (26)

4.5 Considerações Éticas

Apesar da terapia de células CAR-T estar direcionada para o tratamento de crianças com LLA com recaída e/ou refratária, nem todas as crianças com esta patologia nestas condições são candidatas para esta terapia. Os doentes que não têm uma expectativa razoável de sobrevivência no momento da leucoferese ou após a administração das células não devem ser considerados como candidatos para esta terapia. Entre esses grupos, o risco de progressão da doença primária deve ser ponderado entre o risco de acelerar a mortalidade e/ou causar incapacidades graves devido a esta terapia com célula T. (26)

4.6 Resistências

Dois artigos publicados a 1 de outubro de 2018 na *Nature Medicine* sublinham que a resistência adquirida à terapia com células T CD19 direcionada a CAR pode ocorrer através de mutações no gene CD19 ou após a inserção de um recetor de antígeno quimérico (CAR) em células de leucemia, resultando num recetor adjacente sendo disfarçado pelo CAR.

Elena J. Orlando, do Instituto *Novartis* de Pesquisa Biomédica, Cambridge, MA, EUA, e colaboradores relataram que identificaram mutações genéticas no CD19 e perda de heterozigosidade, isto ocorre na recaída à terapia de CAR na Leucemia Linfoblástica Aguda. As mutações estão presentes na grande maioria das células tumorais resistentes e prevê-se que conduzam a uma proteína truncada com um domínio transmembranar não funcional ou ausente e, conseqüentemente, a uma perda do antígeno de superfície. Esta perda irreversível do CD19 defende uma abordagem alternativa de segmentação ou combinação de CAR.

Existe um caso descrito por Carl H. June e J. Joseph Melenhorst, da Escola de Medicina Perelman, da Universidade da Pensilvânia, e do Centro de Cancro de Abramson, Filadélfia, PA, EUA, de um doente que teve uma recaída após 9 meses do uso de células T CD19 (CTL019) para o tratamento de leucemia, devido ao gene CAR ter sido introduzido involuntariamente numa única célula B cancerígena durante a produção de células T, expressando-se como CAR anti-CD19. Desta forma, o produto ligou-se ao epítopo CD19 na superfície das células tumorais, disfarçando-o e conferiu resistência a CTL019.

É necessária uma compreensão completa dos mecanismos que levam a uma resposta anti tumoral eficaz como também nos vários fatores que advêm das resistências ao tratamento.

5 Caso Clínico

Emily Whitehead tinha 6 anos quando foi diagnosticada com Leucemia Linfoblástica Aguda, o tipo de cancro mais comum em crianças.(27)

Até aos 5 anos de idade, Emily apenas se queixava de dores nas pernas ocasionalmente até que aos 5 anos lhe começaram a aparecer inúmeras nódos negros pelo corpo e quando escovava os dentes as gengivas sangravam. Uma noite, Emily queixou-se de dores insuportáveis nas pernas pelo que foi levada para as urgências onde pouco tempo depois foi diagnosticada com Leucemia Linfoblástica Aguda. 85% das crianças com esta doença eram curadas e viviam vidas normais, no entanto, Emily teve duas recaídas após doses intensas de quimioterapia. Nem transplante de medula ajudou a criança a superar a doença que ia agravando.(28)

Sem outras opções, os pais de Emily inscreveram-na num ensaio clínico em imunoterapia de fase 1 para crianças que utilizava a tecnologia CAR-T, nesse momento a ser desenvolvida pelo Dr. Carl June na Universidade da Pensilvânia. O pai de Emily diz “Alguns pais pensariam naturalmente em não colocar os seus filhos na posição de “experiências científicas”, mas tentar estes estudos experimentais é o que leva a desenvolvimentos”(27,28)

O Dr. June tinha pesquisado sobre terapias celulares durante mais de 20 anos, no entanto, muita gente não acreditava que resultaria por se tratar também de uma abordagem arriscada. Apesar destas opiniões, estudos em animais e fases precoces de estudos em humanos para Leucemia Linfoblástica Crónica tinham demonstrado o grande potencial da terapêutica. Emily tornou-se na primeira criança a receber este tratamento no estudo clínico dirigido pelo Dr. Stephan Grupp.(28)

A Emily teve de esperar 6 semanas para que os linfócitos extraídos do seu sangue fossem “preparados” e multiplicados a fim de combater a sua leucemia. Estas células foram então infundidas na Emily.(28)

Este tratamento veio com graves efeitos secundários como febre muito elevada, pressão arterial muito baixa, cara inchada e dificuldade em respirar devido a ter líquido nos pulmões, característicos de síndrome de libertação de citocinas. Emily teve de ter respiração assistida e de ser colocada em coma induzido.(27,28) Isto significava que o seu sistema imunitário estava a responder ao tratamento, no entanto com graves repercussões. O caso de Emily não mostrava melhorias até que, numa última tentativa de controlar a reação exacerbada do seu sistema imunitário, o Dr. June e os médicos de Emily decidiram dar-lhe um medicamento

para a artrite reumatoide que iria suprimir o sistema imunitário, algo nunca antes feito em doentes oncológicos.

Funcionou e 14 dias depois, no seu aniversário, a Emily acordou. Testes posteriores revelaram que o cancro tinha desaparecido e que as suas células T ainda lá estavam prontas para combater qualquer recidiva.(28)

Em maio de 2019, 7 anos após o tratamento, a Emily continua sem sinais de cancro e a viver uma vida normal.(27)



Fig 4 – Emily Whitehead celebra 7 anos livre de cancro.(29)

6 Prospeções Futura/Limitações

As células CAR-T têm revelado ser uma das modalidades terapêuticas mais promissoras para o tratamento de doenças malignas hematológicas refratárias. O design das CAR-T evoluiu drasticamente ao longo dos anos e as características como a co expressão de moléculas co estimuladoras, citocinas e genes suicidas são incorporados para melhorar ainda mais a eficácia e segurança.(18)

Espera-se que a terapia celular adotiva de CAR-T se mostre tão eficaz em tumores sólidos como nas indicações para tumores hematológicos.

Alguns tipos de abordagem a CAR-T a ser estudados e que acarretam esperança de desenvolvimento são por exemplo: moléculas imunomoduladoras pequenas, vírus oncológicos, vacinas e mAbs alvos de tumor, bem como tentativas de ultrapassar a exclusão

de células T e explorar o potencial imunomodulador de quimioterapia e radioterapia (figura 5)(17)

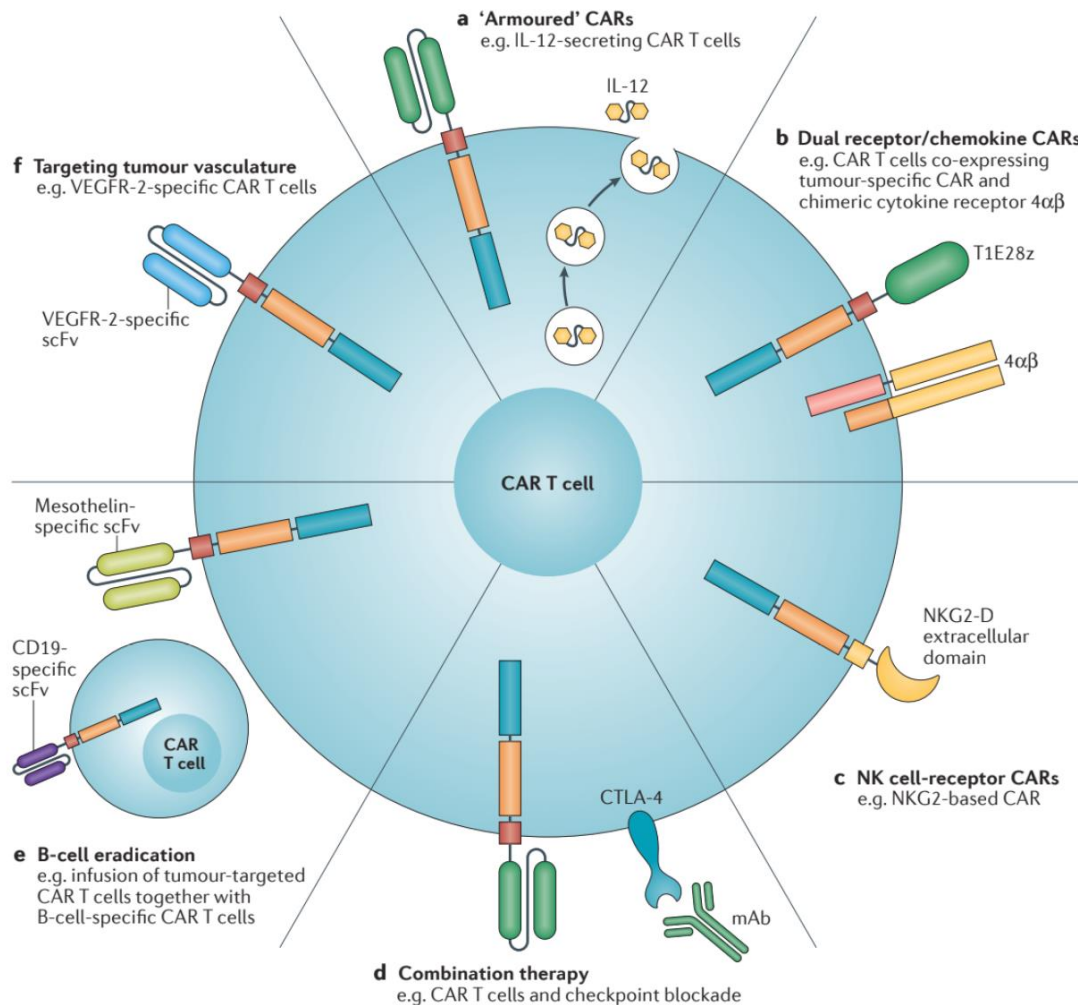


Figura 5 - Abordagens para melhorar a terapia CAR-T(17)

Figure 2 | **Approaches to improve CAR-T-cell therapy.** An overview of the improvements to chimeric antigen receptor (CAR)-T-cell therapy is shown, and clinical trials testing those strategies are indicated in the legend. **a** | Engineered CAR T cells that secrete pro-inflammatory cytokines (armoured CAR T cells; NCT02498912)¹³⁷. **b** | Dual receptor expression to target tumour cells and convert tumour-derived cytokines into T-cell activators (NCT01818323)¹⁶⁴. **c** | Using natural killer (NK)-cell-based recognition domains, such as NKG2-D, in CARs (NCT02203825)¹⁴⁸. **d** | Combination therapy with monoclonal antibodies (mAb) targeting immune-checkpoint inhibitory receptors to relieve immunosuppression (NCT00586391)¹⁵⁴. **e** | Infusion of two populations of CAR T cells to eradicate B cells and enable increased persistence of tumour-specific CAR T cells by preventing antibody responses against their foreign antigen components (NCT02465983)¹⁵⁶. **f** | Targeting the tumour vasculature with CAR T cells, such as VEGFR-2-specific CAR T cells NCT01218867¹⁶⁰. 4αβ, 4αβ chimeric cytokine receptor; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associate antigen-4; T1E28z, T1E28z chimeric antigen receptor; VEGFR-2, vascular endothelial growth factor receptor 2.

Conceptualizar quais são os tipos de tumor que são mais propensos a responder a imunoterapias diferentes, categorizando esses tumores de acordo com a sua capacidade de apresentação de neo antígenos e o seu microambiente ajudará os investigadores a escolher as combinações apropriadas de imunoterapia para cada cancro em particular, e com os avanços contínuos na medicina de precisão, para facilitar a seleção terapêutica personalizada para cada paciente.

Desafios

Muitos investigadores estão correntemente a desenhar estratégias de tratamento de neoplasias hematológicas e tumores sólidos. Desafios desta transição incluem uma seleção cuidadosa do antígeno alvo, gestão de toxicidade “on target, off tumour”, e a modulação da imunossupressão verificada no microambiente do tumor.(17)

Outro desafio destes medicamentos amplamente personalizados é o desenvolvimento de tecnologias eficientes e plataformas clínicas rentáveis para suportar as fases de estudos clínicos posteriores e, ultimamente, a comercialização.(18)

Futuro da Produção

Começar a produzir CAR-Ts com subpopulações de células T definidas que podem ser derivadas de uma coleta de sangue em vez de um produto de leucoferese reduziria a escala e, consequentemente, o custo de fabrico. Investigações sobre novas fontes de células T que poderão aliviar a necessidade de obter células T autólogas também estão a acontecer. (18)

A otimização da libertação de testes de controlo de qualidade adequados e de rastreamento de produtos precisará de melhorar drasticamente em termos de eficiência e rentabilidade. (18)

A simplificação das metodologias de trabalho, o aumento da robustez do processo e a implementação de sistemas fechados e automatizados devem permitir a escalabilidade e reduzir o custo das mercadorias, mantendo a eficiência dos produtos das células CAR-T.(18)

A participação e cooperação entre as várias partes interessadas deve acelerar o caminho para a comercialização.(18)

7 Referências Bibliográficas

1. MedicalNewsToday [Internet]. [cited 2019 Nov 10]. Available from: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/323648.php>
2. Grover PL. The initiation of breast and prostate cancer. Carcinogenesis. 2002;23(7):1095–102.
3. Germain D. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. Endocrinol Metab Clin North Am. 2011;40(3):473–84.
4. Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. Nat Rev Cancer [Internet]. [cited 2019 Nov 10]. Available

from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3536>

5. Feller L, Khammissa RAG, Lemmer J. Biomechanical cell regulatory networks as complex adaptive systems in relation to cancer. *Cancer Cell Int.* 2017;17(1):1–6.
6. Willis RE. Targeted cancer therapy: Vital oncogenes and a new molecular genetic paradigm for cancer initiation progression and treatment. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9).
7. Wang XX, Jiang YZ, Liu XY, Li JJ, Song CG, Shao ZM. Difference in characteristics and outcomes between medullary breast carcinoma and invasive ductal carcinoma: A population based study from SEER 18 database. *Oncotarget.* 2016;7(16):22665–73.
8. van Tong H, Brindley PJ, Meyer CG VT. Parasite Infection, Carcinogenesis and Human Malignancy [Internet]. [cited 2019 Nov 11]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.034>
9. Qian CN, Tan MH, Yang JP, Cao Y. Revisiting tumor angiogenesis: Vessel co-option, vessel remodeling, and cancer cell-derived vasculature formation. *Chin J Cancer.* 2016;35(2):2–7.
10. Mistry DAH, French PW. Circulating phospholipids as biomarkers of breast cancer: A review. *Breast Cancer Basic Clin Res.* 2016;10(stage IV):191–6.
11. Panagopoulou TI, Rafiq QA. CAR-T immunotherapies: Biotechnological strategies to improve safety, efficacy and clinical outcome through CAR engineering. *Biotechnol Adv.* 2019;(June).
12. Sattler. Chapter 1: The role of the immune system beyond the fight against infection. In: *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology.* 2017.
13. Roh KH. Artificial methods for T cell activation: Critical tools in T cell biology and T cell immunotherapy. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1064:207–19.
14. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: Immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(5):273–90.
15. CAR T-Cell Immunotherapy: The 2018 Advance of the Year [Internet]. [cited 2019 Nov 1]. Available from: <https://www.cancer.net/blog/2018-01/car-t-cell-immunotherapy-2018-advance-year>
16. Ti D, Niu Y, Wu Z, Fu X, Han W. Genetic engineering of T cells with chimeric antigen receptors for hematological malignancy immunotherapy. *Sci China Life Sci.* 2018;61(11):1320–32.
17. Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2016;13(6):370–83. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.36>
18. Wang X, Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: Foundation of a promising therapy. *Mol Ther - Oncolytics*. 2016;3(February):16015.
 19. EMA. Kymriah [Internet]. [cited 2019 Mar 3]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/kymriah-epar-medicine-overview_en.pdf
 20. EMA. Yescarta [Internet]. [cited 2019 Sep 22]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/yescarta-epar-medicine-overview_en.pdf
 21. The FDA has approved Novartis' CAR-T therapy Kymriah, opening the way for a new generation of cell therapy treatments against cancer [Internet]. [cited 2019 Aug 26]. Available from: <https://labiotech.eu/medical/car-t-approval-fda-novartis-kymriah/>
 22. Gilead's CAR-T cell therapy Yescarta has been approved by the FDA, making it the first competitor for Novartis' CAR-T Kymriah [Internet]. [cited 2019 Sep 9]. Available from: <https://labiotech.eu/medical/yescarta-kymriah-car-t-therapy/>
 23. EMA. Yescarta [Internet]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yescarta-epar-product-information_en.pdf
 24. EMA. Kymriah [Internet]. [cited 2019 Mar 21]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kymriah-epar-product-information_en.pdf
 25. EMA. RoActemra [Internet]. [cited 2019 Apr 8]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/roactemra>
 26. Mahadeo KM, Khazal SJ, Abdel-Azim H, Fitzgerald JC, Taraseviciute A, Bollard CM, et al. Management guidelines for paediatric patients receiving chimeric antigen receptor T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(1):45–63.
 27. Cancer Research Institute. Emily Whitehead [Internet]. [cited 2019 Feb 26]. Available from: <https://www.cancerresearch.org/immunotherapy/stories/patients/emily-whitehead>
 28. Parker Institute for Cancer Immunotherapy. Emily Whitehead [Internet]. [cited 2019 Feb 26]. Available from: <https://www.parkerici.org/the-latest/from-leukemia-to-cancer-free-how-car-t-immunotherapy-saved-emily-whitehead/?cn-reloaded=1>
 29. Foundation EW. Emily Whitehead [Internet]. [cited 2019 Nov 14]. Available from: <https://twitter.com/ewhiteheadfdn/status/1126817912306561026>